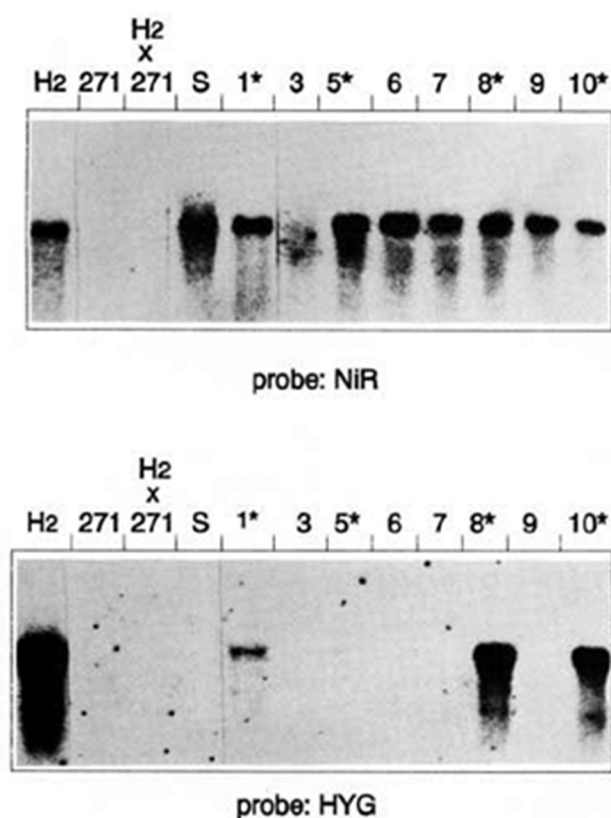


Válaszok Dr Bánfalvi Zsófia bírálatára

Köszönöm doktori dolgozatomban szakszerű bírálatát és értékelését, valamint a kérdéseket, észrevételeket.

Transzkripció géncsendesítéssel kapcsolatos eredmények értékelése

A 11. ábra alapján felmerült bennem az a kérdés, hogy vajon miért nem mutattak hygromicin rezisztenciát azok a vonalak (1*, 8* és 10*), melyekben northern hibridizációval ki lehetett mutatni a HptII mRNS jelenlétét? Igaz ugyan, hogy ezekben a vonalakban a HptII transzkriptum mennyisége kisebb volt, mint a kontrollban, de véleményem szerint – főleg, ami a 8* és 10* vonalakat illeti – ennek elegendőnek kellett volna lenni a rezisztencia megnyilvánulásához.



11. ábra: Northern blot NiR (felső panel) és HYG (alsó panel) próbákkal a szülői, F1 és BC1 nemzedékek dohánynövényein. A #3 vonal a '271' lokuszt, míg a csillaggal jelöltek a H2 lokuszt örökölték. Az 'S' RNS minta nem szelektált BC1 csíranövényekből összekevert növényanyagból származott.

A kísérletekben a hygromicin érzékenységet csíranövényeken teszteltük, a Northern blot viszont kifejlett növényekből kivont RNS felhasználásával készült. Feltételezhető, hogy az egyedfejlődés során egyes növényekben a HptII gén átírása már részben megindult, a gén reaktivációja elkezdődött.

Hogy a csíranövényekben történő átírásról közvetlenül is kapjunk adatot, összegyűjtött, nem szelektált csíranövényekből is vontunk ki RNS-t és beillesztettük a Northern blot mintái közé (11. ábra „S” minta). Ebben az esetben a HptII transzkriptum megjelenését nem tapasztaltuk, ami teljes mértékben megfelel a megfigyelt fenotípusnak.

A *cbp20* szerepének vizsgálatával kapcsolatos eredmények értékelése

Ezeknek az eredményeknek a legnagyobb, illetve tudományos szempontból a legjelentősebb része, a Max Planck Intézet Dr Koncz Csaba által vezetett kölni laboratóriumában született.

A kísérletsorozat sikerének záloga a tapasztalt fenotípusokat okozó genetikai változás gyors meghatározását lehetővé tevő T-DNS mutáns populáció létrehozása volt. Ezúton is köszönöm Dr Koncz Csabának, hogy ehhez az értékes gyűjteményhez kölni laboratóriumában a hozzáférésemet lehetővé tette, és a születő eredményeket a későbbiekben is segítette, támogatta. Az innen származó, mintegy 1400 egyedi mutáns vonal birtokában a kísérletek a továbbiakban több más kutatóhelyen folytak. A pleiotróp fenotípuson alapuló screen-elést Dr Luis Mur segítségével a Wales-i Egyetem üvegházaiban végeztem. Néhány így szelektált mutáns vonal szegregációs analízise Dr Marjori Matzke laboratóriumában zajlott. Végül a *cbp20* mutáció teljes további genetikai, élettani és molekuláris vizsgálat sorozata a gödöllői MBK-ban történt 2002-2003 folyamán. A kísérletek támogatásáért ezúton is köszönet illeti Dr Koncz Csabát valamint Dr Nagy Ferencet is, aki az Intézet akkori főigazgatójaként lehetővé tette munkámat ezen a projekten.

Ugyanakkor a Jelölt azt is kimutatja, hogy a *cbp20* mutáns növény kisebb, mint a vad típus. Nyilvánvaló, hogy egy kisebb növénynek kevesebb vízre van szüksége, mint egy nagyobbnak, azaz azonos méretű cserépben vízmegvonás esetén tovább marad nedves a talaj a kis növény, mint a nagy növény alatt. Nem csoda tehát, hogy 7 napos vízhiányt követően a *cbp20* Arabidopsis növények kevésbé voltak hervadtak, mint a vad típus (24. ábra).

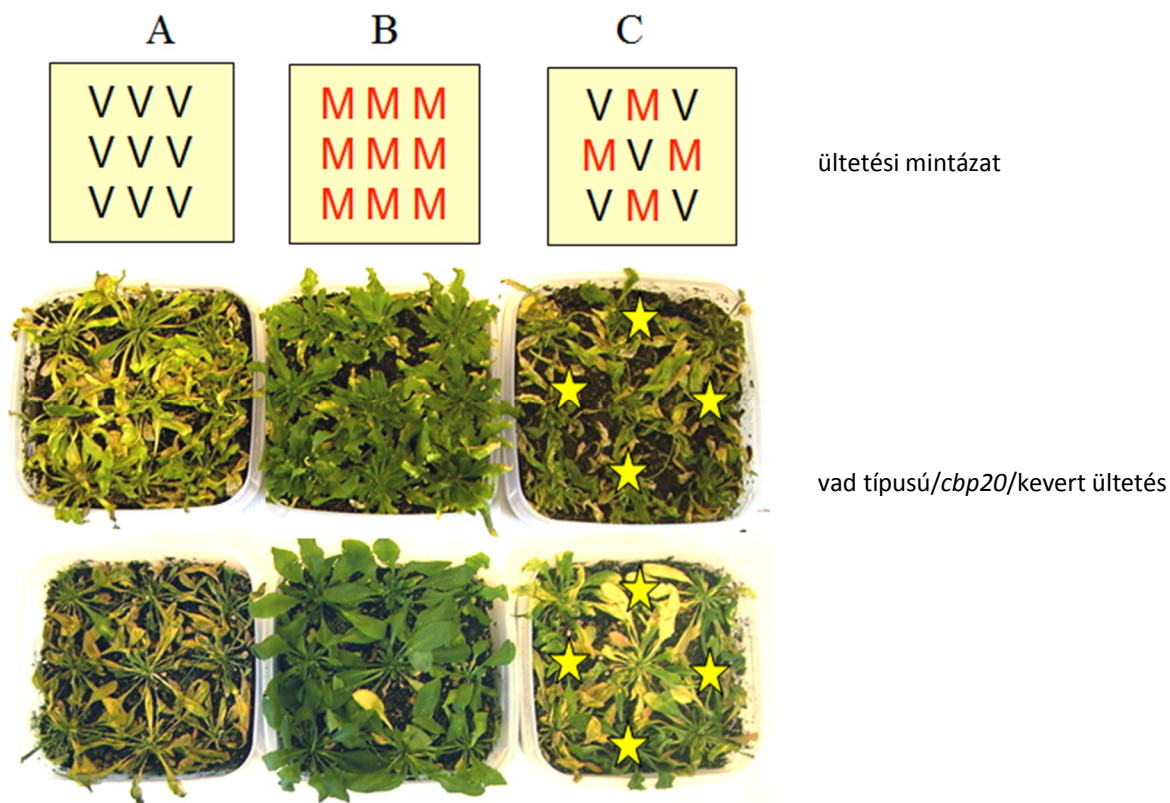
A *cbp20* mutáns egyedfejlődését követő, részletes morfológiai vizsgálatot valóban nem végeztünk erőforrásaink szűkössége miatt. Gyakorlati tapasztalataink azt mutatták, hogy bár a mutáns növények fejlődése lassúbb a vad típusénál, de azok a hosszabb idő alatt közel ugyanakkora méretű, és hasonló mennyiségű biomasszát felmutató növényekké fejlődnek, mint a vad típus. Ez a megfigyelés egybevágott a mutánsunkhoz nagyon hasonló *cbp80/abh1* mutáns mérésekkel is igazolt tulajdonságaival. Hugouvieux és munkatársai (2002) a *cbp80/abh1* mutáns esetében a teljes növény fejlődésének lassulását mutatták ki, ami a virágzásig 5-10 napos lemaradást eredményez (Hugouvieux et al 2002, Figure 5, Table 1). Bár a *cbp80/abh1* mutánsok virágzati tengelye valamelyest rövidebbnek bizonyult a vad típusénál (Hugouvieux et al 2002, Table 1, „kompakt habitus”), az egyéb növekedési paraméterekben nem mutatkozott szignifikáns különbség, ami megfelelt a mi tapasztalatainknak is a *cbp20* mutáns esetében. Hogy szárazságtűrési kísérleteinkben az egyedfejlődésnek ezt a különbségét kiegyenlítsük, a *cbp20* mutáns növényeket mindig egy héttel a vad típusúak előtt vetettük el. Így a virágzási fázis elején mért szárazságtűrést körülbelül egyforma fejlettségű és méretű növényeken, egyforma párologtató levélfelület mellett végezhattük.

Hivatkozás:

Hugouvieux V, Murata Y, Young JJ, Kwak JM, Mackesy DZ, Schroeder JI. (2002) Localization, ion channel regulation, and genetic interactions during abscisic acid signaling of the nuclear mRNA cap-binding protein, ABH1. *Plant Physiol.* 130(3):1276-87.

A Jelölt megállapítja azt is, hogy a cbp20 szárazságtűrő fenotípusa a vad növényekkel együtt ültetve nem jelenik meg. Nem lehet ennek az az egyszerű magyarázata, hogy a nagy növények felveszik a vizet a talajból, így az kiszárad, vagyis, hogy a cbp20 mutáns nem szárazságtűrő, hanem egyszerűen csak kicsi?

A kísérleteket az előbbieken ismertetett okok miatt 8 hetes vad típusú és 9 hetes *cbp20* mutáns növényekkel végeztük. A mutáns és vad típusú növények rozettáinak mérete, átlagos fejlettsége ebben az állapotban körülbelül azonos volt, ami igaz volt a szárazságtűrési kísérletekben a kevert ültetésű tenyészedények növényeire is (33. ábra C).



33. ábra: 7 napig tartó vízhiányos stressz eltérő hatása víztakarékos mutáns és vad típusú növényekre különböző (A: csak vad típus, B: csak mutáns, C: vegyes) ültetési mintázatok esetén. V: vad típus, M: mutáns, csillag: a mutáns növények pozíciója.

Hogy a *cbp20* mutáció specifikus következményei nem befolyásolták a kísérleteink eredményét az is bizonyítja, hogy a hasonló összeállításban vizsgált *era1* víztakarékos mutáns is a *cbp20*-al azonos

módon viselkedett. Az *era1* esetében az egyedfejlődés menetének semmilyen változását nem írták le (Pei et al 1998), illetve ilyent mi sem tapasztaltunk. Kísérleteink fő tanulságaként a víztakarékos szárazságtűrési stratégia sebezhetőségét emelném ki vízért való versenyhelyzet esetén.

Hivatkozás:

Pei Z-M, Ghassemian M, Kwak CM, McCourt P, Schroeder JI (1998) Role of farnesyltransferase in ABA regulation of guard cell anion channels and plant water loss. Science 282, 287–290.

Igaz ugyan, hogy a Jelölt azt állítja, hogy a sötét adaptált 4 hetes „cbp20 mutáns növények a vad típusnál szignifikánsan lassabban veszítették a vizet” (64. oldal), de a leírás alapján nem világos számomra, hogy ez a kísérlet levett levelekre vagy cserepes növények leveleire vonatkozik.

A kísérlet gyökerekről leválasztott, sötétadaptált rozetták vízvesztését mutatja be. Ezzel a vízvesztés perisztómás komponensét tudtuk jellemezni. A kísérlet azt tanúsította, hogy a sötétben zárt sztómák mellett a megvastagodott kutikula a vad típusnál erőteljesebben fogta vissza a kutikuláris párologtatást. Elfogadom Bírálom itt megfogalmazott megjegyzését, miszerint a „transpirációs kísérlet leírásának ... nagyobb hangsúlyt kellett volna kapnia a dolgozatban”.

Vélemény az eredmények hasznosíthatóságáról

Maga a Jelölt is megpróbált antiszensz gátlással csökkentett mennyiségű Cbp20 fehérjét termelő paradicsom vonalakat előállítani

A dolgozatban említett paradicsom géncsendesítési kísérletekkel kapcsolatban kérem, vegye figyelembe másik Bírálom hasonló felvetésére adott válaszat, miszerint ezek az eredmények nem részei a dolgozatom téziseinek.

Jelölt hivatkozik Pieczynski és munkatársai (2013) közleményére is .. (amiben) Nincs azonban szó arról, hogy milyen volt ezeknek a növényeknek a gumóhozama és milyen volt a gumók beltartalmi értéke.

A hivatkozott publikáción kívül a lengyel kutatócsoport egy további közleményében (Szweykowska-Kulinska et al 2013) leírta, hogy szabadföldi kísérleteik szerint: „Tuber yield, structure, starch and reducing sugars content analyses showed no differences between Desiree and amiR80.2-14 transgenic potato plants.”. Ezen az állításon túl azonban kísérleti eredményeket nem közöltek.

Hivatkozások:

Pieczynski M, Marczewski W, Hennig J, Dolata J, Bielewicz D, Piontek P, Wyrzykowska A, Krusiewicz D, Strzelczyk-Zyta D, Konopka-Postupolska D, Krzeslowska M, Jarmolowski A, Swezykowska-Kulinska Z.

(2013) Down-regulation of CBP80 gene expression as a strategy to engineer a drought-tolerant potato. Plant Biotechnol J. 11(4):459-69.

Szweykowska-Kulinska Z, Pieczynski M, Marczewski W, Hennig J, Dolata J, Bielewicz D, Piontek P, Wrzykowska A, Krusiewicz D, Strzelczyk-Zyta D, Konopka-Postupolska D, Krzeslowska M, Jarmolowski A. (2013) Downregulation of Cap Binding Protein 80 gene expression as a strategy to engineer a drought-tolerant potato BioTechnologia 94(1):59-65.

Tekintettel a cbp20 mutáció Arabidopsis-ban is tapasztalt pleiotróp hatására, nem hiszem, hogy érdemes lenne „haszonnövények mutagenizált populációjából pl TILLING eljárással, célzottan, nem transzgénikus mutáns kiválasztására, ami az esetleges GMO mentes mezőgazdasági hasznosítás lehetőségét is nyitva hagyja”, mint ahogy azt a disszertáció 87. oldalán olvashatjuk.

Ezen a ponton vitába szállnék Bírálómmal. A dolgozatomban bemutatott és hivatkozott eredmények meggyőzően bizonyítják, hogy a növényi sejtmagi cap kötő komplex funkcióvesztéses mutációi két fajban (lúdfű, burgonya) csökkentett párologtatáshoz és szárazságtűrés kialakulásához vezethetnek. Egyetértek Bírálómmal abban, hogy a *cbp* mutánsok esetleges pleiotróp hatásai leronthatják a haszonnövényekben elért szárazságtűrés kedvező hatásait, így egyes (pl intenzív) termesztési rendszerekben az ilyen növények nem biztos, hogy versenyképesek lesznek. Még ha ez bekövetkezik, akkor is más (pl kedvezőtlen adottságú, gyakori aszályokkal sújtott) termőterületeken a hasznos tulajdonság összességében előnyt jelenthet a termesztésben, és a mutációt hordozó haszonnövény értékes lehet. Ezért továbbra is úgy gondolom, hogy érdemes lenne több fajban is előállítani és megvizsgálni a funkcióvesztéses mutánsokat. Természetesen az így előállított növényeket komplex vizsgálatnak kell alávetni szántóföldi körülmények között, ami a pleiotróp tulajdonságok (pl só-tűrés esetleges csökkenése, lassúbb fejlődés) kedvezőtlen hatásait méri fel. A növényi mutáció előállítására valóban nem biztos, hogy a TILLING eljárás a legalkalmasabb. Az RNS interferencia mellett a Szabados László bírálómna adott válaszában is említett egyéb, a genomok szerkesztésére alkalmas új biotechnológiai eljárások gyorsabb és célzottabb beavatkozást tesznek lehetővé (cink ujj, TALE vagy CRISPR/Cas nukleázok alkalmazása, szintetikus oligonukleotidokkal indukált mutagenézis).

A kutikulára vonatkozó eredményeket illetően igazat adok abban a Jelöltnek, hogy a „kutikula, illetve viasz képződésben fontos gének meghatározása a bélyegekhez kapcsolódó genetikai markerek kifejlesztésére ad lehetőséget” (87. oldal). Ahhoz azonban, hogy ezeket a markereket a szárazságtűrés javítására használjuk a nemesítési programokban, a dolgozatban szereplő kísérleteknél sokkal több bizonyítékra lenne szükség a kutikula szerkezetének a szárazságtűréssel való összefüggésére, mint ahogy ez egy alma és egy búzafajta példáján bemutatásra került a dolgozatban.

Bírálómmal mindenképpen egyetértek abban, hogy hasznos lenne a dolgozatban szereplő kísérletek kiterjesztése, például több búzafajta bevonása a vizsgálatokba, illetve a kiválasztott alma gének funkcionális jellemzése. A haszonnövények kutikula képzéséhez kapcsolható gének funkcionális azonosítása kurrens kutatási terület, napjainkban számos ilyen témájú közlemény jelenik meg (pl uborka CER1 gén – Wang et al 2015). Ezekkel az eredményekkel a gének esetleges gyakorlati

hasznosításának biztonsága növelhető. Továbbra is fenntartom azt a véleményemet, hogy egyes, a kutikulával kapcsolatba hozható gének, direkt funkcionális azonosítással támogatva különösen, nemesítési programokban mint jelölt gének hasznos szerepet játszhatnak. A szakirodalom több esetben is beszámol ilyen projektekről. Ezekkel egyenlőre nem feltétlenül a szárazságtűrésre való nemesítésben találkozhatunk, ami valóban egy különösen komplex probléma. Kínai kelkáposzta esetében például Zhang és munkatársai (2013) a levél hamvasság bélyeg térképezésekor a célgént a *CER2* génhez való homológia alapján azonosították. További példaként az alma termelésben gyakorlati jelentősége van a parásodás jelenségének, ami a kutikula fejlődési zavarával jár együtt. A parásodás bélyegének QTL térképezésekor Lashbrook és munkatársai (2015) a kutikulához kapcsolható jelölt gének közül azonosították *MdSHN3*-at, mint a fenotípusért felelőssé tehető célgént. Az általunk feltárt, kutikula specifikus alma szekvenciák között is szerepelt egy *WIN/SHN* homológ, amikből az alma genom egy kis géncsaládot kódol. Az általunk vizsgált szekvencia azonban különbözik a Lashbrook és munkatársai által leírt géntől. Úgy gondolom ezek a példák meggyőzően érvelnek a mellett, hogy az általunk feltárt szekvenciák is hasznos segítőivé válhatnak egyes nemesítési projekteknél.

Hivatkozások:

Wang W, Zhang Y, Xu C, Ren J, Liu X, Black K, Gai X, Wang Q, Ren H. (2015) Cucumber ECERIFERUM1 (CsCER1), which influences the cuticle properties and drought tolerance of cucumber, plays a key role in VLC alkanes biosynthesis. *Plant Mol Biol.* 87(3):219-33.

Zhang X, Liu Z, Wang P, Wang Q, Yang S, Feng H. (2013) Fine mapping of BrWax1, a gene controlling cuticular wax biosynthesis in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*) *Mol Breeding* 32:867–874.

Lashbrooke J, Aharoni A, Costa F. (2015) Genome investigation suggests MdSHN3, an APETALA2-domain transcription factor gene, to be a positive regulator of apple fruit cuticle formation and an inhibitor of russet development. *J Exp Bot.* 2015 Jul 28. pii: erv366. [Epub ahead of print]

Budapest, 2015 Szeptember 2

Dr Papp István